Aus der medizinischen Abteilung des Tiefenauspitals der Stadt Bern
Chefarzt: DR. W. HADORN

und dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: PROF. DR. A. VON MURALT

Arbeit unter Leitung von DR. W. WILBRANDT

Untersuchungen über die Lichtstreuung von Erythrozytensuspensionen und ihre Verwendbarkeit zur lichtelektrischen Blutkörperchenzählung

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae der Universität Bern

vorgelegt von

Rolf Michael Steinmann

aus St. Gallen und Twann (Bern)

1942.

Auf Antrag des Herrn Prof. Dr. A. von Muralt
von der medizinischen Fakultät zum Druck
als Dissertation genehmigt.

Bern, den 4. März 1942.

Der Dekan der Med. Fakultät
Prof. Dr. A. v. Muralt

Separatdruck aus Zeitschrift für Klinische-Medizin, Band 141, 1942.

Aus der medizinischen Abteilung des Tiefenauspitals der Stadt Bern
Chefarzt: DR. W. HADORN
und dem Physiologischen Institut (Hallerianum) der Universität Bern
Direktor: PROF. DR. A. VON MURALT

Arbeit unter Leitung von DR. W. WILBRANDT

Untersuchungen über die Lichtstreuung von Erythrozytensuspensionen und ihre Verwendbarkeit zur lichtelektrischen Blutkörperchenzählung

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Würde eines Doctor medicinae der Universität Bern

vorgelegt von

Rolf Michael Steinmann
aus St. Gallen und Twann (Bern)

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Durchstrahlt man eine Erythrocytensuspension mit Licht und mißt die geradlinig durchtretende Lichtmenge mit einer dahinter angebrachten lichtelektrischen Zelle, so erhält man infolge der Lichtschwächung durch Streuung an den Zellen Photoströme, die von der Zellkonzentration der Suspension abhängen. Solche Anordnungen sind in verschiedenen Ausführungen zur objektiven Verfolgung von Hämolysevorgängen verwendet worden. *Ponder* (s. *Ponder* 1934) verwendete eine Vakuumphotozelle, *Jacobs* (1930) eine Anordnung, deren Prinzip dem eines Schichtdicken-Kolorimeters ähnlich ist, *Netter* und *Ørskov* (1932) eine Sperrschichtphotozelle. Ebenfalls mit einer Sperrschichtzelle untersuchte *Wilbrandt* (1938) die quantitative Abhängigkeit der Lichtstreuung von der Zellzahl, der Zellgröße und dem Abstand zwischen Suspension und Photozelle.

Die Möglichkeit, die Lichtstreuung auch zur klinischen Erythrocytenzählung zu verwenden, wurde schon von *Jacobs* sowie von *Netter* und *Ørskov* erwähnt, aber nicht näher untersucht. Die zu überwindende Schwierigkeit liegt darin, daß zwischen Zellzahl und Lichtstreuung zwar eine eindeutige Beziehung besteht, wenn verschieden konzentrierte Suspensionen desselben Blutes verglichen werden, daß aber beim Vergleich von Blutsuspensionen verschiedener Personen Unregelmäßigkeiten auftreten. Diese schon früher in unveröffentlichten Versuchen beobachteten Schwankungen wurden 1938 auf Unterschiede der Zellgröße zurückgeführt, da die Lichtstreuung nicht nur von der Zahl, sondern auch von der Größe der Zellen abhängt (*Ørskov* 1935, *Parpart* 1935, *Wilbrandt* 1938). Die photoelektrisch aufgenommene Kurve der osmotischen Resistenz z. B. verläuft im nichthämolytischen Teil nicht waagrecht, sondern weiter mit steigernder Konzentration flach abfallend. Die Lichtstreuung nimmt also mit abnehmendem Zellvolumen zu.

Diese Richtung der Änderung gibt einen Hinweis auf ihre physikalische Grundlage. Sie beruht offenbar nicht darauf, daß für einen Lichtstrahl die Wahrscheinlichkeit, eine Zelle zu treffen, mit abnehmendem

Zellvolumen sinkt; denn dann müßte die Streuung bei Schrumpfung der Zellen abnehmen. Daß sie zunimmt, deutet darauf hin, daß das Entscheidende nicht eigentlich die Größe der Zellen, sondern der Sprung im Brechungsindex an ihrer Grenzfläche ist. Bei der osmotischen Schwellung wird die außerordentlich hohe Hämoglobinkonzentration der Zelle vermindert, bei der Schrumpfung noch weiter erhöht, und in gleicher Richtung ändert sich der Brechungsindex und damit die Streuung. Die Daten der vorliegenden Arbeit liefern für diese Anschauung noch weitere Stützen.

Weder das Volumen der Zellen, noch ihr Hämoglobingehalt, noch die von beiden Größen abhängende Hämoglobinkonzentration in der Zelle, die nach unserer Ansicht die Streuung in erster Linie beeinflußt, sind von Mensch zu Mensch konstant. Es ist daher zu verstehen, daß die Lichtstreuung von Blutsuspensionen verschiedener Herkunft bei gleicher Zellzahl nicht konstant ist. Zweck des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit ist hauptsächlich, die Schwankungen quantitativ zu untersuchen und dadurch, wenn möglich, eine Basis für den Ausbau einer optischen Methode der Blutkörperchenzählung zu schaffen. Zum gleichen Zweck wird im ersten Teil der Arbeit die Abhängigkeit der Lichtstreuung ein und derselben Suspension von verschiedenen Faktoren (Zellgröße, Zellform, Abstand Suspension—Lichtquelle) noch einmal unter neuen Gesichtspunkten quantitativ untersucht.

Methodik.

Statt einer Sperrschichtphotozelle wurde eine Vakuumzelle vom Typ Caesopress [1] benützt. Diese Zellen sind so empfindlich, daß sie direkt an Galvanometer mittlerer Empfindlichkeit angeschlossen werden können. Wir arbeiteten mit dem Multiflexgalvanometer von *Lange*. Die Anordnung entsprach im wesentlichen der von *Wilbrandt* 1938 beschriebenen. Auf einer optischen Bank befand sich in variablem Abstand von der Zelle ein Cuvettenhalter für 4 Cuvetten, die nebeneinander (senkrecht zur Richtung der Bank) angebracht waren und abwechslungsweise in den Strahlengang geschoben werden konnten. Als Lichtschutz diente ein schwarzer ausziehbarer Balg zwischen Cuvettenschieber und Zelle, der mit beiden fest verbunden war. Dahinter waren auf der Bank eine Irisblende und die Lichtquelle montiert. Es wurde ein Osram-Niedervoltlampe (5 V, 25 W, Typ 8 Wi) verwendet, die von einem Transformator gespeist wurde. Die Primärspannung des Transformators wurde mit einem Spannungsregler (Voltageregulator Raytheon) stabilisiert. Es wurde so eine gute Lichtkonstanz erzielt. Vor jeder Messung wurde mit Hilfe der Blende die Lichtintensität so eingestellt, daß die Lichtquelle ohne zwischengeschaltete Cuvette einen Ausschlag von 20 zeigte.

I. Weitere Versuche über die Lichtstreuung in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren.

A. Der Abstand zwischen Suspension und Photozelle. Die schon in einer früheren Arbeit (*Wilbrandt* 1938) beschriebene und mit Kurvenscharen belegte Abhängigkeit des Photometerausschlages vom Abstand

[1] Hersteller: Pressler, Leipzig.

zwischen Photozelle und Suspension wurde aus folgendem Grund noch einmal untersucht. Aus den Kurven 1938 geht zwar schon klar hervor, daß mit zunehmendem Abstand die Lichtstreuung steigt und daß die Abhängigkeit des Photometerausschlages von der Zellzahl bei kleinen Zellkonzentrationen steiler wird, wenn man den Abstand vergrößert. Worauf es für die Erythrocytenzählung jedoch ankommt, ist nicht die absolute, sondern die relative Empfindlichkeit, nicht $\frac{\Delta \text{ Photometerausschlag}}{\Delta \text{ Zellzahl}}$, sondern $\frac{\Delta \text{ Photometerausschlag}}{\Delta \text{ Zellzahl}} \times$ Zellzahl. Diese Größe erhält man am anschaulichsten, wenn man den Photometerausschlag nicht gegen die Zellkonzentration selbst aufträgt, wie in der 1938 veröffentlichten Kurve, sondern gegen den Logarithmus der Zellkonzentration. Dann gibt die Steilheit der Kurve die relative Empfindlichkeit an. Am einfachsten wird das erreicht, wenn man mit geometrischen Verdünnungsreihen von Zellsuspensionen arbeitet und die Ablesungen bei den verschiedenen Verdünnungsstufen in gleichem Abstand von einer Stufe zur andern als Ordinate aufträgt, mit andern Worten: wenn man die Nummer der Verdünnungsstufe als Abszisse, den Ausschlag als Ordinate benützt.

Abb. 1 zeigt die Abhängigkeit der Photometerablesung von der Zellzahl in dieser Darstellungsart für verschiedene Abstände Suspension—Photozelle. Das Verdünnungsverhältnis ist 1 : 2, d. h. eine Abszisseneinheit ist log 2. Die Verdünnungsstufe 1 ist Vollblut. Es ergeben sich Kurven von S-förmiger Gestalt, die parallel verlaufen. Der untere flache Schenkel der S-Kurve ist das Gebiet hoher Zellkonzentrationen, wo fast kein Licht gestreut wird. Dazwischen liegt ein Konzentrationsbereich, in dem die relative Empfindlichkeit maximal und einigermaßen konstant ist. Dieser Bereich umfaßt etwa 4 Verdünnungsgrade. Man kann daher mit bester und annähernd konstanter Empfindlichkeit zwischen 2 Zellkonzentrationen arbeiten, die sich wie 1 : 16 verhalten. Das genügt für die Anforderungen der Erythrocytenzählung. Nimmt man als Grenzen 0,75 Millionen und 12 Millionen Erythrocyten/mm^3, so wird man äußerst selten außerhalb dieser Grenzen zu zählen haben. Man muß also den Verdünnungsgrad so wählen, daß der steile Teil der Kurve zwischen diese Grenzen fällt.

Der parallele Verlauf der Kurven bei verschiedenem Abstand zwischen Zelle und Suspension zeigt, daß es einen optimalen Abstand nicht gibt. Der beste Konzentrationsbereich liegt für verschiedene Abstände an verschiedenen Stellen, aber die erreichbare maximale Empfindlichkeit ist gleich. Welchen Abstand man wählt, ist also irrelevant, wenn nur für den gewählten Abstand im richtigen Konzentrationsbereich gearbeitet wird, oder, um einen analogen Ausdruck aus der Verstärkertechnik zu benützen, wenn man das „Arbeitsgebiet" richtig auf der „Kennlinie" wählt.

B. Die Zellgröße. Auch für die Abhängigkeit der Lichtstreuung von der Zellgröße erhebt sich die gleiche Frage: ist die Änderung der Lichtstreuung mit einer Änderung der Empfindlichkeit verbunden oder verschieben sich auch hier die „Kennlinien" parallel, d. h. mit gleichbleibender Empfindlichkeit?

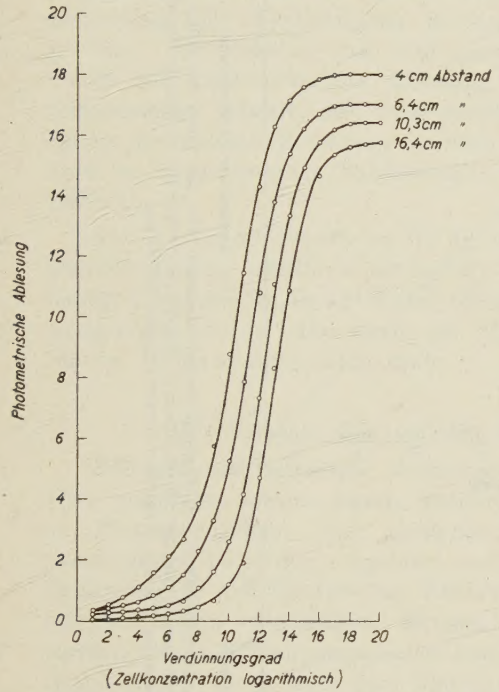

Abb. 1. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von Erythrosuspensionen steigenden Verdünnungsgrades vom Abstand zwischen Suspension und Photozelle. Ordinate: Photometrische Ablesung als Maß der Lichtdurchlässigkeit. Abszisse: Verdünnungsgrad logarithmisch. (Eine Einheit = Verdünnung 1 : 2; Verdünnungsgrad 1 = unverdünntes Blut.)

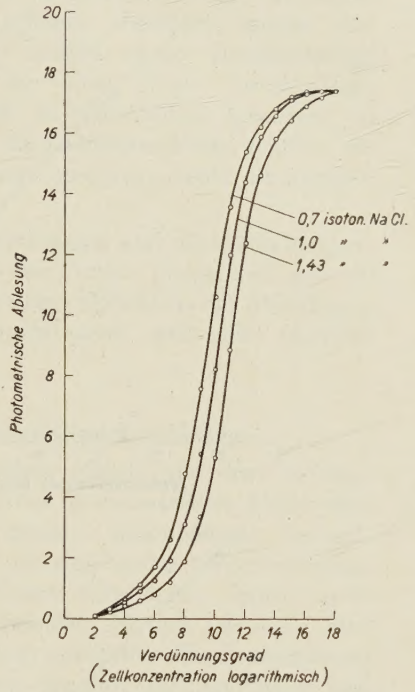

Abb. 2. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von Erythrocytensuspensionen steigenden Verdünnungsgrades von der Größe der Zellen: Suspensionen in verschieden konzentrierten Salzlösungen. Darstellung wie in Abb. 1.

Abb. 2 zeigt Kurven von Verdünnungsreihen 1 : 2 in 0,7, 1,0 und 1,43fachen isotonischen Kochsalzlösungen. Die 3 Kurven verlaufen auch hier parallel. Die Lichtstreuung ist zwar bei gleicher Zellkonzentration stärker bei den geschrumpften und schwächer bei den geschwollenen Zellen, aber die Empfindlichkeit im „Arbeitsgebiet" der Kurven ist gleich. Wenn also der Einfluß der Zellgröße bzw. des Brechungsindex sich in Grenzen hält, die die Messung nicht aus dem „Arbeitsgebiet" herausdrängen, wird man hoffen können, unter Anbringung einer entsprechenden Korrektur eine gegebene Eichkurve auch bei abnormem Brechungsindex benützen zu können. Die zu bearbeitende Frage ist dann, ob sich die Höhe der jeweils notwendigen Korrektur

aus leicht meßbaren Größen bestimmen läßt. Dieser Frage gelten die Versuche des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit.

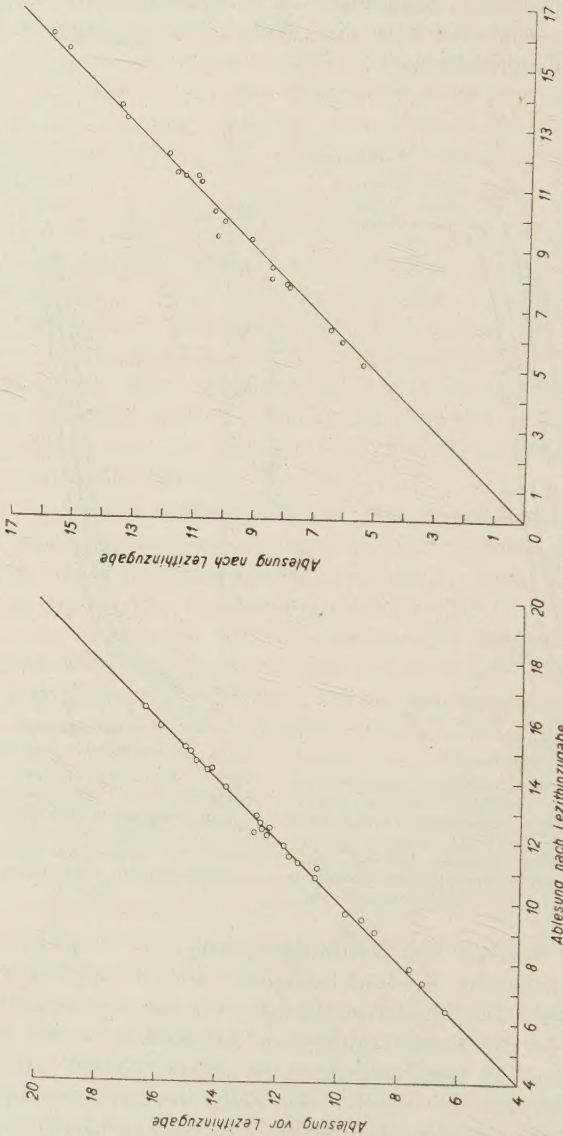

Abb. 3 a u. b. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von Erythrocytensuspensionen von der Form der Zellen. Ablesungen vor und nach Lecithinzugabe (Umwandlung der Scheibenform in Kugelform) jeweils für die gleiche Suspension. a Isotonische Salzlösung, b achtfach hypertonische Salzlösung.

C. Die Form der Erythrocyten. Die normale diskoide Form der roten Blutkörperchen ändert sich in Salzlösungen leicht, es entstehen Stechapfel- und später Kugelformen. Es ist daher wichtig zu wissen, ob Formveränderungen der Zellen die Lichtstreuung beeinflussen. Man

kann nun mit einem Zusatz von einer Spur Lecithin die Erythrocyten in Kugelform überführen (s. *Ponder* 1934). Es wurde daher bei einer größeren Zahl der unten zu besprechenden Versuche geprüft, ob Lecithinzusatz den Photometerausschlag ändert. Die kleinste Lecithinkonzentration, die bei einem Zusatz von einem Tropfen zu 5 ccm Suspension zuverlässig alle Eyrthrocyten in Kugelform überführt, wurde ausprobiert. Unmittelbar vor und nach Zusatz dieser Lecithinmenge wurde die photometrische Ablesung bei einer Reihe verschiedener Suspensionen geprüft, und zwar sowohl in isotonischen Lösungen, in denen die meisten Erythrocyten noch ihre normale Form zeigten, als auch in hypertonischen Salzlösungen mit ausgesprochener Stechapfelbildung.

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse für die isotonische und die stärkst hypertonische Lösung (achtfach isotonisch). Die Punkte gruppieren sich bei beiden Lösungen um die 45°-Achse, die völliger Gleichheit der Ablesungen entsprechen würde. Die Form der Erythrocyten spielt also offenbar für die Lichtstreuung keine Rolle.

II. Versuche über optische Blutkörperchenzählung.

Während die bisherigen Versuchsreihen jeweils mit dem gleichen Blut ausgeführt worden waren, wurden nun photometrische Ablesungen an Blutsuspensionen einer größeren Anzahl verschiedener Normalpersonen und Patienten ausgeführt und mit gleichzeitig vorgenommenen Zählungen in der *Bürker*schen Zählkammer verglichen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen: Mengen zwischen 10 und 150 cmm Blut wurden mit je 10 ccm isotonischer Lösung verdünnt. Die so erhaltenen Suspensionen, die je nach dem Blutstatus der untersuchten Person und nach der verwendeten Blutmenge bei normaler Verdünnung (1 : 200) verschiedenen Erythrocytenzahlen pro Kubikmillimeter Blut entsprechen würden, wurden dann erstens in der Zählkammer gezählt (100 Quadrate), und die Erythrocytenzahl so berechnet, als ob das Blut 1 : 200 verdünnt wäre. Zweitens wurde je 1 ccm davon nochmals 1 : 6 mit 4 verschiedenen konzentrierten Lösungen verdünnt und sofort für die Streulichtmessung benützt. Der Abstand zwischen Suspension und Photozelle war 6 cm. Diese Kombination von Abstand und Blutverdünnung war auf Grund der Kurven in Abb. 1 so gewählt, daß Normalblut eine Ablesung etwa in der Mitte der „Kennlinie" ergab. (Es stellte sich allerdings später heraus, daß das verwendete „Normalblut" etwas polyzytämisch war, s. unten.)

Als Verdünnungslösung für die Streulichtmessung wurde zunächst eine modifizierte *Hayem*-Lösung hergestellt, die 0,6% Kochsalz, 0,8% Natriumsulfat und 0,25% Sublimat enthielt. Später wurde aus unten zu besprechenden Gründen das Sublimat weggelassen und es wurde

eine Lösung verwendet, die aus einem Volumteil isotonischer Natriumsulfatlösung (0,13 Mol.) und 7 Volumenteilen isotonischer Natriumchloridlösung (0,16 mol.) gemischt war und der auf 40 Volumteile noch ein Volumteil isotonischer Natriumphosphatpufferlösung vom p_H 7,4 zugesetzt wurde [1]. Von beiden Lösungen wurden 4 Konzentrationen hergestellt: I isotonisch, II doppelt isotonisch, III vierfach isotonisch und IV achtfach isotonisch. Die hypertonischen Lösungen enthielten die gleichen Salze in gleichem Verhältnis, nur konzentrierter. Die Lichtstreuung wurde im allgemeinen sofort, nach 5, 10 und 20 Min. abgelesen.

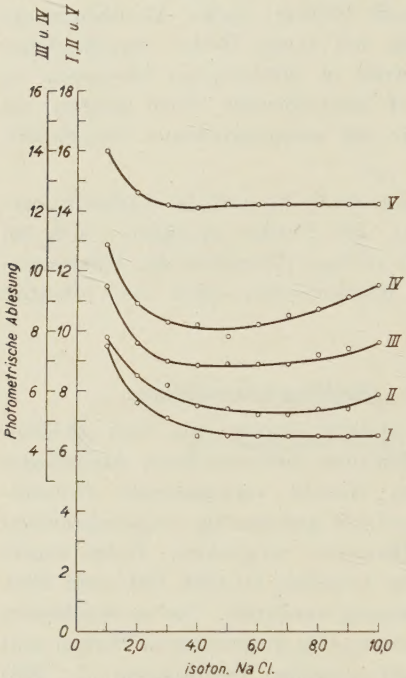

Abb. 4. Abhängigkeit der Lichtstreuung in Suspensionen gleicher Zellzahl von der Salzkonzentration der Suspensionslösung. Fünf Versuchsreihen jeweils mit konstanter Zellkonzentration, aber unter Variation der Salzkonzentration aufgenommen.

Der Zweck der Verwendung hypertonischer Lösungen war folgender. Suspendiert man Blut bei gleicher Zellkonzentration in Salzlösungen steigender Hypertonie, so nimmt die Lichtstreuung zu. Diese Zunahme wurde oben auf die Erhöhung der Hämoglobinkonzentration in der Zelle zurückgeführt. Es sollte nun untersucht werden, ob sie nicht einem Grenzwert zustrebt, der etwa durch die Löslichkeit des Hämoglobins bedingt wäre und daher bei Zellen verschiedenen Ausgangsvolumens auf ungefähr gleicher Höhe läge. Vorversuche, die in Abb. 4 wiedergegeben werden, zeigten tatsächlich, daß für Suspensionen desselben Blutes die photometrische Ablesung bei steigender Salzkonzentration nicht unbeschränkt sinkt, sondern von einer bestimmten Salzkonzentration an, die in der Gegend von vierfach isotonisch liegt, konstant bleibt oder wieder ansteigt. Der Anstieg dürfte auf Verlust der selektiven Undurchlässigkeit für Kationen und beginnender osmotischer Schwellung, evtl. bis zur Hämolyse, beruhen (vgl. *Wilbrandt* 1941). Wäre der Grenzwert bei Blut verschiedener Personen gleich, so hätte man in der Verwendung hypertonischer Lösungen ein Mittel, die individuellen Schwankungen in der Lichtstreuung pro Zelle auszugleichen.

Es sei schon hier bemerkt, daß diese Erwartung sich nicht in dem Maß bestätigt hat, daß die Schwierigkeiten auf diese Weise überwunden

[1] Herstellung siehe von *Muralt*, Praktische Physiologie. Berlin 1942.

werden könnten. Es wurde daher noch ein anderer Weg eingeschlagen. Die Annahme, daß den individuellen Schwankungen Unterschiede der Hämoglobinkonzentration im Innern der Erythrocyten zugrunde liegen, ließ daran denken, daß möglicherweise eine Beziehung zum Hämoglobingehalt der einzelnen Erythrocyten besteht, als dessen Maß in der Klinik im allgemeinen der Färbeindex bestimmt wird. Wie weit das zutrifft, wird nach unserer Deutung vor allem davon abhängen, wie weit Hämoglobinkonzentration und Hämoglobingehalt parallel gehen, d. h. wie konstant das durchschnittliche Zellvolumen ist.

Es wurde daher bei einer Anzahl Patienten mit pathologischem Färbeindex neben Erythrocytenzählung und lichtelektrischer Streuungsmessung noch bei jedem Versuch der Hämoglobingehalt mit dem Zeiß-Hämometer bestimmt. Zu diesem Zweck wurde 1 ccm der Zählsuspension mit 0,2 ccm n-HCl hämolysiert und wie üblich mit dem Hämometer untersucht. Das Hämometer wurde von der gleichen Person, die die Bestimmungen ausführte, am Spektrophotometer von *König-Martens* geeicht (der „persönliche Fehler" ist bei diesem sonst vorzüglichen Apparat wegen nicht idealer Farbgleichheit von Bedeutung). Aus der korrigierten Ablesung wurde unter Berücksichtigung der Verdünnung die Hämoglobinkonzentration so berechnet, als wäre die Zellsuspension 1 : 200 verdünnt gewesen. Da die Berechnung der Erythrocytenzahl auf der gleichen Basis erfolgte, konnten die beiden Messungen aufeinander bezogen und aus ihnen der Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrocyten berechnet werden. Der Normalwert dieser Größe (die dem „Färbeindex" wegen der Ungleichheit der verschiedenen als „100%" bezeichneten Hämoglobingehalte in der Klinik vorgezogen werden sollte) ist bekanntlich 32×10^{-12} g (z. B. 5 Millionen Erythrocyten und 16 g Hämoglobin pro 100 ccm Blut). Das Ergebnis dieser Parallelmessung, das unten wiedergegeben wird, war eine deutliche Korrelation der individuellen Schwankungen mit dem Hämoglobingehalt der Einzelzelle, so daß die Hoffnung besteht, auf dieser Grundlage eine Korrektur der erforderlichen Art bestimmen zu können.

A. Versuche mit sublimathaltigen Lösungen. Abb. 5 zeigt die Versuche, die mit der modifizierten *Hayem*-Lösung angestellt wurden. Das Ergebnis erscheint zunächst sehr entmutigend. Eine deutliche Korrelation zwischen lichtelektrischer Ablesung und Kammerzählung besteht fast überhaupt nicht, so daß man den Eindruck gewinnt, die individuellen Schwankungen machten die optische Zählung unmöglich. Auch die Ablesungen in hypertonischen Lösungen, von denen in Abb. 5 b diejenigen bei achtfacher Hypertonie wiedergegeben sind (die in den andern Konzentrationen verhielten sich gleich), geben kein besseres Bild.

Eine zufällige Beobachtung führte zur Erklärung dieses unangenehm überraschenden Ergebnisses. Bei dem Versuch, eine Suspension durch Wasserzusatz zu hämolysieren, zeigte sich, daß die Erythrocyten auch

bei starker Verdünnung bis beträchtlich unter die hämolytische Grenzkonzentration sich nicht auflösten. Ihr osmotisches Verhalten wird offenbar durch das Sublimat völlig verändert. Es ist bekannt, daß niedrigere Konzentrationen von Sublimat zu Hämolyse führen. Diese Hämolyse, die in unveröffentlichen Versuchen analysiert wurde, ist osmotisch und beruht auf Verlust der Undurchlässigkeit der Zellmembran für Kationen („kolloidosmotische Hämolyse", vgl. *Wilbrandt* 1941). Die in höheren Konzentrationen auftretende Änderung scheint dagegen

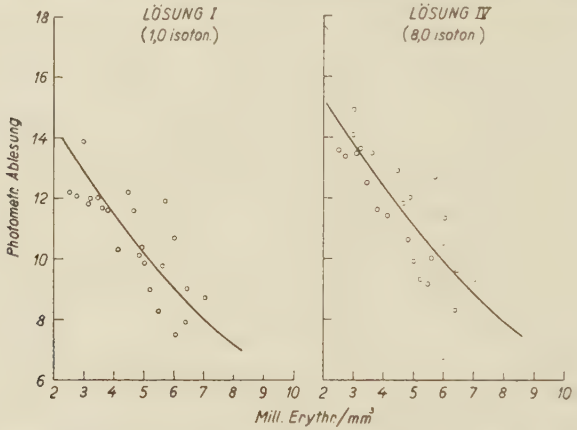

Abb. 5. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von der Erythrocytenkonzentration (durch Kammerzählung ermittelt) bei Blut verschiedener Versuchspersonen in sublimathaltigen Salzlösungen.

eine Art „Härtung" der Membran zu sein, durch die osmotische Volumänderungen behindert bis aufgehoben werden (vgl. z. B. *Bechhold* und *Kraus* 1920 und *Meneghetti* 1922). Für die Kammerzählung ist der Sublimatgehalt der Lösung natürlich bezüglich der Haltbarkeit sowohl der Lösung als auch der Zellsuspension günstig. Die Lichtstreuung wird aber auch durch ihn empfindlich verändert, wie der Vergleich der Abb. 5 mit den Versuchen zeigt, die nun auf Grund dieser Beobachtung in sublimatfreien Salzlösungen ausgeführt wurden.

B. Versuche mit sublimatfreien Salzlösungen. Abb. 6 zeigt eine Anzahl Versuche in isotonischer phosphatgepufferter Kochsalz-Natriumsulfat-Lösung ohne Sublimat. Hier besteht nun eine deutliche Korrelation zwischen Kammerzählung und lichtelektrischer Ablesung. Die Kreise geben das Ergebnis der Kammerzählung, die Striche den doppelten mittleren Fehler der Zählung an. (Der doppelte statt des einfachen mittleren Fehlers wurde nach dem Vorschlag von *Michaelis* deshalb gewählt, weil er die Grenzen angibt, zwischen denen das richtige Resultat mit 95% Wahrscheinlichkeit liegt, während die Grenzen des einfachen mittleren Zählers nur 68% Wahrscheinlichkeit geben). Es läßt sich

durch die Meßpunkte eine Kurve ziehen, die nur in wenigen Fällen außerhalb der Grenzen des doppelten mittleren Fehlers liegt.

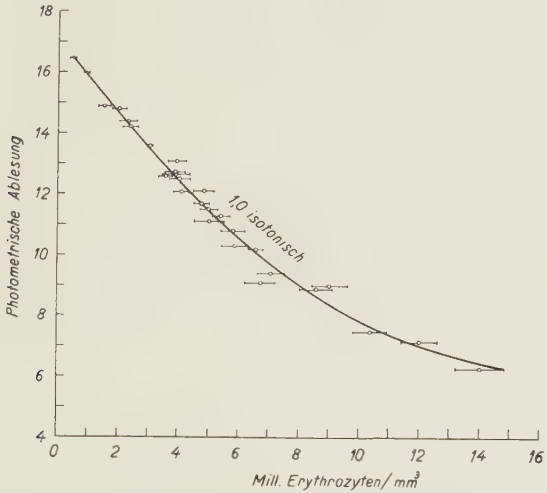

Abb. 6. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von der Zellkonzentration (durch Kammerzählung ermittelt) bei Blut verschiedener Versuchspersonen in isotonischer sublimatfreier Salzlösung. Die Kreise geben die Mittelwerte, die Striche die Grenzen des doppelten mittleren Fehlers der Kammerzählung an.

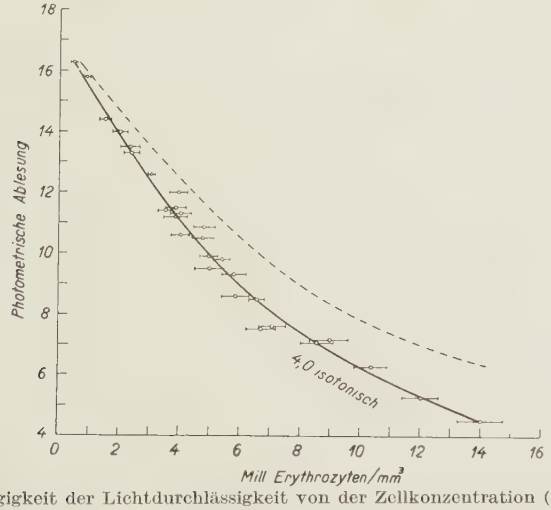

Abb. 7. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von der Zellkonzentration (durch Kammerzählung ermittelt) bei Blut verschiedener Versuchspersonen in vierfach isotonischer Salzlösung. Zum Vergleich ist die Mittelkurve aus Abb. 6 (isotonische Salzlösung) gestrichelt miteingezeichnet.

Die auch bei dieser Lösung noch bestehenden Unregelmäßigkeiten verschwinden nicht, wenn man statt der Ablesungen in isotonischer diejenigen in vierfach isotonischer Lösung gegen die Kammerzählung aufträgt. Abb. 7 zeigt die so erhaltene Kurve. Der Vergleich der

einzelnen Meßpunkte (es sind die gleichen Zählungen wie in Abb. 6) zeigt zwar in mehreren Fällen eine bessere Annäherung an die Mittelkurve als in isotonischer Lösung; aber der Unterschied ist nicht bedeutend. Dagegen liegt die ganze Kurve, wie zu erwarten war, tiefer als die (zum Vergleich gestrichelt miteingezeichnete) Mittelkurve in isotonischer Lösung.

Die Hoffnung, durch Verwendung hypertonischer Lösungen die Schwankungen ausgleichen zu können, erfüllte sich also nicht. Die weiter unten wiedergegebene Kurve von Fällen mit pathologischem Färbeindex zeigt das noch deutlicher. Außerdem wurde bei den beiden

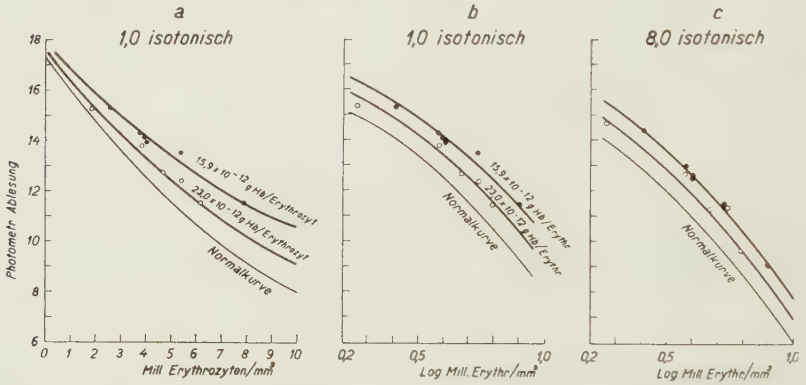

Abb. 8a—c. Abhängigkeit der Lichtdurchlässigkeit von der Zellkonzentration (durch Kammerzählung ermittelt) bei zwei Fällen mit vermindertem Färbeindex in isotonischer sublimatfreier Salzlösung. Die miteingezeichnete „Normalkurve" ist aus Abb. 6 entnommen. a zeigt die Daten in linearer, b und c in logarithmischer Darstellung der Erythrocytenzahl.

konzentriertesten Lösungen (vierfach und achtfach isotonisch) die Beobachtung gemacht, daß die Ablesungen nicht konstant waren, sondern im Verlauf von 20 Min. anstiegen, und zwar in der achtfach isotonischen Lösung IV fast regelmäßig, in der vierfach isotonischen III gelegentlich. Es kam sogar vor, daß die Ablesungen in IV von Anfang an höher waren als die in III (vgl. auch Abb. 4, in der allerdings zwischen Mischung und Ablesung eine beträchtliche Zeitspanne lag). Offenbar werden in den höher konzentrierten Lösungen die Erythrocyten kationenpermeabel und schwellen wie bei der „kolloidosmotischen Hämolyse" (*Wilbrandt* 1941).

Die in Abb. 6 und 7 benützten Fälle sind solche mit Färbeindices, die nicht weit von der Norm abweichen. (Sie wurden bei der Zählung nicht bestimmt, sondern aus den Krankengeschichten entnommen.) Es zeigte sich aber bald, daß bei Fällen mit stark herabgesetztem Hämoglobingehalt der Einzelzelle photometrische Ablesungen resultieren, die beträchtlich höher liegen als der Mittelkurve entspricht. Abb. 8a zeigt das für zwei Fälle, bei denen mehrere Zählungen vorgenommen wurden.

Die Abweichung von der Normalkurve ist systematisch, auch bei Zählungen an verschiedenen Tagen, und deutlich höher bei dem Fall mit dem niedrigeren Färbeindex. Es wurden in gleicher Weise noch eine größere Anzahl von andern Fällen mit vermindertem Färbeindex untersucht, deren Kurven in Abb. 8 aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht mitaufgenommen wurden, die aber durchaus das gleiche Resultat ergaben.

Die Abweichung von der Normalkurve ist derart, daß die den photometrischen Ablesungswerten zugehörigen Werte der Kammerzählung für einen und denselben Fall jeweils gegenüber der Norm mit einem konstanten Faktor multipliziert erscheinen. Das zeigt sich deutlicher als in Abb. 8a bei logarithmischer Auftragung der Erythrocytenzahlen (Abb. 8b). Es ergeben sich dann Kurven, die zur Normalkurve parallel verlaufen.

Dabei zeigt sich übrigens, daß die Wahl des „Arbeitsgebietes" bei unseren Versuchen nicht gut gelungen ist. Die Ablesungen liegen im oberen Teil der „Kennlinie". Das liegt erstens daran, daß die Normalzahl 5 Millionen im logarithmischen Maßstab nicht in der Mitte des in Betracht kommenden Konzentrationsbereiches liegt, sondern in der oberen Hälfte. Es wird sich also empfehlen, etwa die Ablesung bei einer Erythrocytenzahl von 3 Millionen auf die Mitte der „Kennlinie" zu legen. Zweitens stellte sich bei der Zählung heraus, daß das für die Versuche der Abb. 1—3 verwendete Blut außerdem auch noch eine etwas erhöhte Erythrocytenzahl hatte.

Der Grad der Parallelverschiebung bei dem Fall mit dem sehr niedrigen Zellhämoglobingehalt von $15{,}9 \times 10^{-12}$ g entspricht etwa einer Änderung der Zellzahl um 50%. Die eingangs diskutierte Frage, ob die Messung durch eine solche Verschiebung über das „Arbeitsgebiet der Kennlinie" hinaus verlagert werden kann, kann daher praktisch verneint werden, da das „Arbeitsgebiet" etwa 4 Potenzen von 2 umfaßt.

Abb. 8c zeigt schließlich noch die Ablesungen bei den gleichen 2 Fällen in Lösung IV (achtfach isotonisch) und die Normalkurve dieser Lösung. Auch hier ergeben sich parallel verschobene Kurven. Wenn auch die Parallelverschiebung vielleicht nicht ganz so groß ist wie bei Lösung I, so ergibt sich doch, wie schon oben erwähnt, daß durch Verwendung hypertonischer Lösungen die Abweichungen von der Normalkurve nicht eliminiert werden können. Außerdem zeigen die Kurven größere Unregelmäßigkeit als bei Lösung I, was auf der gleichen Ursache beruhen dürfte, wie die schon erwähnte zeitliche Inkonstanz der Ablesung.

Es wurde nun die Frage geprüft, ob der Grad der Parallelverschiebung in Beziehung zum Hämoglobingehalt des Einzelerythrocyten gebracht werden kann, wie aus Abb. 8a wahrscheinlich wird. Zu diesem Zweck

wurden bei einer Anzahl von Versuchen diese Größe, wie oben beschrieben, gleichzeitig mit der Kammerzählung und der lichtelektrischen Messung bestimmt. Aus der Normalkurve wurde die der lichtelektrischen Ablesung zugehörige Erythrocytenzahl B entnommen und aus ihr und der tatsächlich durch Kammerzählung ermittelten Erythrocytenzahl A das Verhältnis A/B gebildet. Dieses Verhältnis wurde dann gegen den

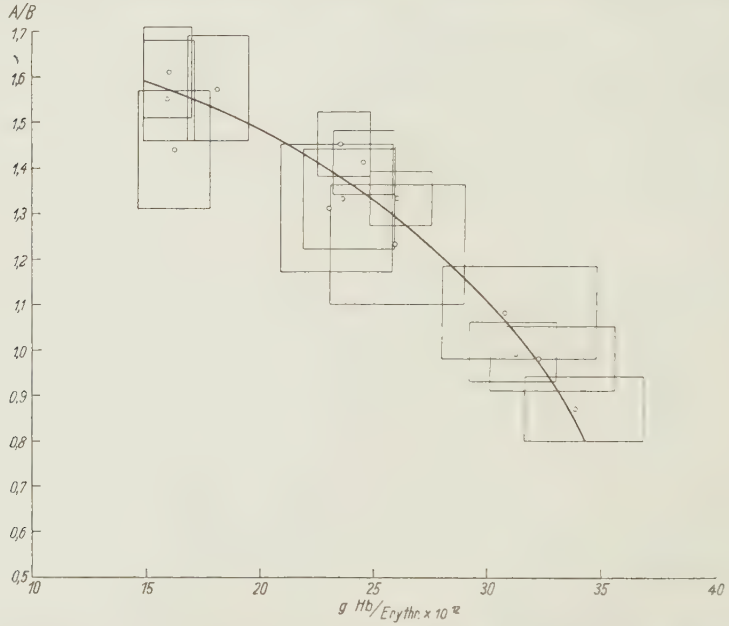

Abb. 9. Die Abweichung von der normalen Kurve bei Fällen mit vermindertem Färbeindex in Abhängigkeit vom mittleren Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrocyten. Die Kreise geben die Mittelwerte an, die Vierecke die Grenzen des doppelten mittleren Fehlers der Kammerzählung, der sowohl in den Ordinaten- als in den Abszissenwert eingeht. Näheres siehe Text.

Hämoglobingehalt des Einzelerythrocyten aufgetragen. Da hier sowohl in die Daten der Abszissen als der Ordinaten das Resultat der Kammerzählung mit ihrer Fehlerbreite eingeht, wurden um die Kreise, die den Mittelwerten entsprechen, Rechtecke gezeichnet, die den doppelten mittleren Fehler für A/B als Ordinatenseite, denjenigen für den Hämoglobingehalt des Einzelerythrocyten als Abszissenseite angeben.

Das Ergebnis zeigt Abb. 9. Es ergibt sich tatsächlich eine deutliche Korrelation. Durch die Meßpunkte läßt sich eine Kurve ziehen, die nirgends außerhalb der Grenzen des doppelten mittleren Fehlers fällt. (Diese Grenzen sind allerdings durch das zweimalige Eingehen des Zählfehlers weit.) Mit welchem Erfolg diese Korrelation zur Ermittlung einer Korrektur der individuellen Schwankungen benützt werden kann, müssen nun weitere Versuche zeigen.

Diskussion.

Die Versuche des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit zeigen zunächst, daß auch bei Blut verschiedener normaler Personen die Lichtstreuungsablesungen bei Variation der Zellzahl sich nahe um eine ähnliche Kurve gruppieren wie bei Suspensionen desselben Blutes. Immerhin liegt eine gewisse Streuung vor. Diese Streuung ist zweifellos zum Teil auf die Fehlerbreite der Kammerzählung zurückzuführen. Einzelne Ablesungen, die um mehr als den doppelten mittleren Fehler von der Kurve entfernt liegen, zeigen jedoch, daß die Schwankungen auch durch die Lichtstreuung mitbedingt sind. Ganz eindeutig wird das bei Fällen mit stark pathologischem Färbeindex, bei denen die Abweichungen ausnahmslos größer als der doppelte mittlere Fehler sind.

Die Hoffnung, mit hypertonischen Lösungen die Schwankungen eliminieren zu können, hat sich nicht bestätigt, offenbar aus zwei Gründen. Einmal scheint die an sich schon labile Impermeabilität der Erythrocyten für Kationen bei Hypertonie rasch zu leiden. Darauf deutet die Tatsache, daß die Ablesungen bei achtfacher Hypertonie fast immer und auch schon bei vierfacher Hypertonie nicht selten mit der Zeit anstiegen. Zweitens aber scheint die Hilfsannahme, daß es einen für Erythrocyten verschiedener Personen annähernd konstanten Grenzwert der Schrumpfung gibt, nicht zuzutreffen. Daß eine Tendenz in der Richtung des Ausgleichs bei höheren Konzentrationen existiert, wird zwar durch die Fälle wahrscheinlich, bei denen die Ablesungen in hypertonischer Lösung näher der Normalkurve lagen als in isotonischer, aber der Effekt ist, wenn überhaupt reell, gering und reicht jedenfalls für den verfolgten Zweck nicht aus, wie das Verhalten der Fälle mit pathologischem Färbeindex deutlich zeigt.

Wichtig für die Frage der optischen Erythrocytenzählung ist dagegen die gefundene Korrelation zwischen Hämoglobingehalt des Einzelerythrocyten und Abweichung von der Normalkurve. Auch hier besteht natürlich wieder die Frage, ob die Streuung um die Mittelkurve dieser Korrelation (Abb. 9) auch auf der Fehlerbreite der Kammerzählung beruht und die Korrelation selbst strikt einer einfachen Kurve folgt, oder ob der Zusammenhang zwischen den beiden Größen noch durch andere Faktoren kompliziert wird. Nur im ersteren Fall würde sich hoffen lassen, mit Hilfe einer entsprechenden Korrektur eine Zählmethode von physikalischer Genauigkeit ausbauen zu können. Die Tatsache, daß die Mittelkurve der Abb. 9 nirgends außerhalb des doppelten Fehlers der Zählung fällt, läßt das möglich scheinen, beweist es aber nicht. Wir glauben eher, daß tatsächlich noch weitere Faktoren eintreten, wobei vor allem an die Zellgröße zu denken ist. Wenn unsere Deutung korrekt ist, wonach der Sprung im Brechungsindex an der Grenzfläche die mittlere Streuung der einzelnen Zelle bestimmt, wäre eine eindeutige Korrelation zwischen Hämoglobingehalt der Einzelzelle und

dieser mittleren Streuung nur bei konstantem Zellvolumen zu erwarten. Damit ist aber nicht zu rechnen. Es scheint sogar eher, daß das Volumen größere Schwankungen zeigt als die Hämoglobinkonzentration in der Zelle. *Bönniger* (1919) sowie *Meyer-Bisch* (1919) haben bei sekundären Anämien Hämatokritbestimmungen gemacht und häufiger Mikrocytose (verringertes Volumen der Einzelzelle) als echte Hypochromie (verringerte Hämoglobinkonzentration in der Zelle) gefunden. Ähnliche Ergebnisse hatte *C. Fröhlich* (1921). *Schartum-Hansen* (1935) gibt sogar an, bei Anämien sei die Hämoglobinkonzentration in der Zelle konstant (35,9%) und begründet damit den Vorschlag, Hämatokritbestimmungen zur Bestimmung des Hämoglobingehalts des Blutes heranzuziehen. Immerhin zeigt die Durchsicht seiner Versuchsdaten, daß die Konstanz der Zellhämoglobinkonzentration nur im Mittel gilt, während die Einzelfälle Abweichungen zwischen —10 und +15% zeigen. Jedenfalls wird bei der Fortsetzung unserer Untersuchungen dem Zellvolumen besondere Aufmerksamkeit zu schenken sein.

Zusammenhang.

Die Untersuchung der photoelektrischen Lichtstreuungsmessung von Blutsuspensionen wurde fortgesetzt. Die früher beschriebene Abhängigkeit des photometrischen Ausschlages vom Abstand zwischen Suspension und Lichtzelle ist derart, daß die als „Kennlinien" bezeichneten Empfindlichkeitskurven (Lichtstrom gegen den Logarithmus der Zellkonzentration aufgetragen) sich bei Variation des Abstandes parallel verschieben. Es gibt also für jeden Abstand einen als „Arbeitsgebiet" bezeichneten Konzentrationsbereich maximaler und für alle Abstände gleicher Empfindlichkeit. In gleicher Weise verhalten sich die „Kennlinien" bei Zellsuspensionen in Salzlösungen verschiedener Konzentration, d. h. bei verschieden großen Zellen derselben Person. Die Form der Zellen beeinflußt die Lichtstreuung nicht.

Bei Blutsuspensionen verschiedener Personen wird die Korrelation zwischen Lichtstreuung und Zellzahl durch andere Faktoren kompliziert, von denen bisher der Hämoglobingehalt des einzelnen Erythrocyten untersucht wurde. Es besteht eine positive Korrelation zwischen dem mittleren Hämoglobingehalt der Einzelzelle und der mittleren Lichtstreuung der Einzelzelle.

Literatur.

Bechhold, H u. *W. Kraus:* Biochem. Z. **109**, 226 (1920). — *Bönniger:* Z. klin. Med. **87**, 450 (1919). — *Fröhlich:* Fol.haemat. (Lpz.) **27**, 109 (1921). — *Jacobs, M. H.:* Biol. Bull. Mar biol. Labor. Woods Hole **58**, 104 (1930). — *Meneghetti, E.:* Biochem. Z. **131**, 38 (1922). — *Meyer-Bisch:* Z. f. exper. Pathol. **20**, 54 (1919). — *Michaelis, L.:* Einführung in die Mathematik, S. 310. Berlin 1927. — *Netter, H.* u. *S. Ørskov:* Pflügers Arch. **231**, 135 (1932). — *Ørskov, S.:* Biochem. Z. **279**, 241 (1935). — *Parpart, A. K.:* J. cellul. a. comp. Physiol. **7**, 153 (1935). — *Ponder, E.:* The Mammalian Red Cell, Berlin 1934. — *Schartum-Hansen, H.:* Fol. haemat. (Lpz.) **54**, 22 (1935). — *Wilbrandt, W.:* Pflügers Arch. **241**, 289 (1938); **245**, 22 (1941).

Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz A.G., Würzburg. — Printed in Germany.